دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

عنوان:

تخلیص آنزیم کربونیک انیدراز II انسانی و مطالعه اثرات مهارشوندگی آن توسط سلکوکسیب

نگارش:

معصومه مهرابی

اساتید راهنما:

دکتر سیروس قبادی
دکتر رضا خدارحمی

بهمن ماه ۱۳۸۷

چکیده

آنزیم کربونیک انیدراز II انسانی (hCAII, EC ۴. ۲. ۱. ۱) یک متالوآنزیم حاوی یون روی است که هیدراته شدن برگشت پذیر دی اکسید کربن به بی‌کربنات و پروتون را کاتالیز می‌کند. از آن‌جا که مهار آنزیم کربونیک انیدراز در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان و گلوکوما (آب سیاه) مؤثر است، در این تحقیق اثر سلکوکسیب (یک داروی سولفونامیدی) بر روی ساختار و عملکرد آنزیم کربونیک انیدراز II انسانی (یکی از ایزوزیم‌های سیتوزولی آنزیم) توسط روش‌های مختلف از جمله اسپکتروسکوپی مرئی- فرابنفش، فلوئورسانس ذاتی و خارجی، دو رنگ نمایی دورانی (CD) و گرماسنجی روبشی افتراقی (DSC) در بافر تریس ۲۰ mM، pH ۷/۷۵ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج سینتیکی نشان داد که سلکوکسیب فعالیت استرازی کربونیک انیدراز را به‌صورت رقابتی از نوع ساده خطی مهار می‌کند. داده‌های بدست آمده ازDSC و اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس با استفاده از آکریل آمید و ANS، همراه با محاسبه آب‌گریزی سطحی پروتئین(PSH) ، نشان داد که در حضور سلکوکسیب مقداری فشردگی در ساختار آنزیم کربونیک انیدراز ایجاد می‌شود. آنالیز اشترن- ولمر معلوم کرد که مکانیسم خاموش‌کنندگی درگیر در فرآیند اتصال از نوع استاتیک است. آنالیز پارامترهای ترمودینامیکی اتصال نشان داد که پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های آب‌گریز نقش اصلی را در پایداری کمپلکس برگشت پذیر ایجاد شده بین آنزیم و دارو دارند. نمودار جاب نیز مشخص کرد که اتصال آنزیم و سلکوکسیب با استویکیومتری ۱ به ۱ اتفاق می‌افتد. نتایج CD در ناحیه فرابنفش دور نشان داد که در حضور سلکوکسیب اندکی افزایش در محتوای مارپیچ آلفا ساختار دوم hCA II ایجاد می‌شود در حالی‌که نتایج CD در ناحیه فرابنفش نزدیک القا فشردگی اندک توسط اتصال سلکوکسیب به آنزیم را نشان داد. در مجموع این‌طور می‌توان نتیجه گرفت که، اتصال سلکوکسیب به جایگاه فعال آنزیم hCA II همراه با مهارشوندگی خطی آنزیم، خاموش شدن فلوئورسانس آن و قدری فشردگی در ساختار دوم و سوم آن است.

لغات کلیدی: مطالعه اتصال، سلکوکسیب، مهارشوندگی رقابتی، خاموش‌شوندگی فلوئورسانس، کربونیک انیدراز II انسانی.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پیش گفتار ۲

۱-۲- تاریخچه ۴

۱-۳- خانواده کربونیک انیدراز ۵

۱-۳-۱-α-کربونیک انیدراز ۷

۱-۳-۱-۱- کربونیک انیدراز II (CA II) ۱۰

۱-۳-۲- β-کربونیک انیدراز ۱۲

۱-۳-۳- γ-کربونیک انیدراز ۱۲

۱-۴- ارتباط کربونیک انیدراز با برخی از بیماری‌ها ۱۳

۱-۵- مهارکننده‌های کربونیک انیدراز ۱۹

۱-۵-۱- سولفونامیدها ۱۹

۱-۵-۲- آنیون‌های با قابلیت اتصال به فلز ۲۰

۱-۶- سلکوکسیب ۲۱

۱-۷- سینتیک مهار شوندگی آنزیمی ۲۲

۱-۷-۱- مهار شوندگی رقابتی ۲۳

۱-۷-۲- مطالعه سینتیک آنزیمی در حضور مهارکننده رقابتی از طریق رسم نمودار ۲۴

۱-۷-۳- مهار شوندگی غیر رقابتی و نا رقابتی ۲۷

۱-۸- تخلیص پروتئین ۲۸

۱-۸-۱- آماده سازی نمونه ۲۹

۱-۸-۲- رسوب دهی با نمک ۲۹

۱-۸-۳- دیالیز ۳۱

۱-۸-۴- کروماتوگرافی ۳۱

عنوان	صفحه

۱-۸-۵- کروماتوگرافی تعویض یون ۳۲

۱-۹- مطالعه بنای فضایی پروتئین ۳۴

۱-۹-۱- روش‌های نوری تشخیص بنای فضایی پروتئین ۳۴

۱-۹-۱-۱- کاربرد تکنیک CD در مطالعه تغییرات بنای فضایی پروتئین‌ها ۳۵

۱-۹-۱-۲- فلوئورسانس ۳۶

۱-۹-۱-۲-۱- استفاده از فلوئورسانس در مطالعهٔ پروتئین‌ها ۳۷

۱-۹-۱-۲-۱-۱- فلوئورسانس خارجی ۳۸

۱-۱۰- هدف از انجام این تحقیق ۴۰

فصل دوم

مواد و روش‌ها

۲-۱- فهرست مواد مورد استفاده ۴۲

۲-۲- فهرست دستگاه‌های مورد استفاده ۴۳

۲-۳- خالص سازی آنزیم کربونیک انیدرازII از اریتروسیت‌های انسانی ۴۴

۲-۳-۱- جداسازی عصاره خام آنزیم کربونیک انیدراز II ۴۴

۲-۳-۱-۱- مرحله اول ۴۴

۲-۳-۱-۲- مرحله دوم ۴۴

۲-۳-۱-۳- مرحله سوم ۴۴

۲-۳-۲- دیالیز ۴۵

۲-۳-۳- رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۴۵

۲-۳-۴- کروماتوگرافی تعویض آنیونی ۴۶

۲-۳-۵- تعیین مرتبه خلوص و بازده خالص سازی ۴۶

۲-۴- SDS-PAGE پروتئین‌ها ۴۷

۲-۴-۱- تهیه محلول‌های لازم برای الکتروفورز ۴۸

عنوان	صفحه
۲-۴-۱-۱- محلول ذخیره اکریل آمید (۳۰/۸ ٪)	۴۸
۲-۴-۱-۲- بافر ژل پایین	۴۸
۲-۴-۱-۳- بافر ژل بالا	۴۸
۲-۴-۱-۴- بافر الکترود (بافر مخازن)	۴۹
۲-۴-۱-۵- بافر نمونه (۵X)	۴۹
۲-۴-۱-۶- محلول پرسولفات آمونیوم (۱۰٪)	۴۹
۲-۴-۱-۷- محلول TEMED (۱۰٪)	۴۹
۲-۴-۲- آماده سازی ژل و بارگذاری نمونه‌ها	۴۹
۲-۴-۲-۱- ژل پایین (ژل جداکننده)	۵۰
۲-۴-۲-۲- ژل بالا (ژل فشرده‌کننده)	۵۰
۲-۴-۳- رنگ آمیزی ژل:	۵۱
۲-۴-۳-۱- محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی ژل	۵۱
۲-۴-۳-۱-۱- رنگ آمیزی با آبی کوماسی R-۲۵۰	۵۱
۲-۴-۳-۱-۲- محلول رنگ‌بر	۵۲
۲-۴-۳-۱-۳- محلول نگهداری ژل (اسید استیک ۷٪)	۵۲
۲-۴-۳-۲- روش رنگ آمیزی	۵۲
۲-۵- تغلیظ آنزیم و روش نگهداری آن	۵۲
۲-۶- سنجش غلظت پروتئین‌ها	۵۳
۲-۶-۱- روش لوری	۵۳
۲-۶-۱-۱- تهیه محلول‌های لازم جهت تعیین غلظت پروتئین به روش لوری	۵۴
۲-۶-۱-۱-۱- محلول A	۵۴
۲-۶-۱-۱-۲- محلول B	۵۴
۲-۶-۱-۱-۳- محلول C	۵۴
۲-۶-۱-۲- مراحل سنجش	۵۵

عنوان **صفحه**

۲-۶-۲- تعیین غلظت آنزیم خالص با استفاده از ضریب جذب آن ۵۶

۲-۷- سنجش فعالیت آنزیم ۵۶

۲-۷-۱- سنجش فعالیت آنزیم در حضور داروی سلکوکسیب ۵۷

۲-۸- مطالعات گرماسنجی و تعیین پایداری گرمایی ۵۷

۲-۹- اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس ۵۸

۲-۹-۱- اندازه‌گیری فلوئورسانس ذاتی ۵۸

۲-۹-۲- اندازه‌گیری فلوئورسانس خارجی ۵۹

۲-۹-۳- تعیین آب‌گریزی سطحی پروتئین (PSH) ۶۰

۲-۹-۴- مطالعه اثر خاموش کنندگی آکریل آمید بر فلوئورسانس ذاتی آنزیم ۶۱

۲-۹-۵- مطالعه اثر خاموش کنندگی سلکوکسیب بر فلوئورسانس ذاتی آنزیم و تعیین نوع مکانیسم خاموش‌کنندگی ۶۲

۲-۹-۶- تعیین استویکیومتری اتصال دارو به آنزیم ۶۲

۲-۹-۷- محاسبه تعداد جایگاه‌های اتصال و ثابت اتصال ۶۳

۲-۹-۸- تعیین پارامترهای ترمودینامیکی اتصال دارو به آنزیم ۶۳

۲-۱۰- مطالعه دو رنگ نمایی دورانی (CD) ۶۴

فصل سوم

نتایج

۳-۱- تخلیص آنزیم کربونیک انیدراز II ۶۷

۳-۲- رسم منحنی استاندارد برای روش لوری ۶۸

۳-۳- بررسی فعالیت آنزیم کربونیک انیدراز II ۶۹

۳-۴- بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم در حضور داروی سلکوکسیب و تعیین نوع مهار شوندگی ۷۰

۳-۴-۱- رسم نمودار لاینویور- برک ۷۰

۳-۴-۲- رسم نمودار ثانویه و تعیین ثابت مهارکنندگی ۷۱

عنوان **صفحه**

۳-۴-۳- تعیین برگشت‌پذیری مهار شوندگی آنزیم کربونیک انیدراز II توسط سلکوکسیب ۷۲

۳-۵- بررسی پایداری حرارتی آنزیم توسط روش گرماسنجی روبشی افتراقی (DSC) ۷۳

۳-۶- نتایج فلوئورسانس ۷۵

۳-۶-۱- بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در حضور سلکوکسیب با استفاده از فلوئورسانس ذاتی ۷۵

۳-۶-۲- اثر خاموش کنندگی آکریل آمید بر فلوئورسانس ذاتی آنزیم ۷۶

۳-۶-۳- تعیین نوع مکانیسم خاموش‌کنندگی سلکوکسیب ۷۷

۳-۶-۴- بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در حضور سلکوکسیب با استفاده از فلوئورسانس خارجی ۷۹

۳-۶-۵- محاسبه آب‌گریزی سطحی پروتئین (PSH) ۸۰

۳-۶-۶- استوکیومتری اتصال دارو به آنزیم ۸۱

۳-۶-۷- تعیین تعداد جایگاه‌های اتصال و ثابت اتصال ۸۲

۳-۶-۸- بررسی پارامترهای ترمودینامیکی اتصال دارو به آنزیم ۸۴

۳-۷- بررسی تغییرات ساختار دوم و سوم آنزیم کربونیک انیدراز II در حضور غلظت‌های مختلف سلکوکسیب توسط روش CD ۸۵

۳-۷-۱- بررسی تغییرات ساختار دوم ۸۵

۳-۷-۲- بررسی تغییرات ساختار سوم ۸۶

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بررسی کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق ۸۹

۴-۲- نگاهی به آینده ۹۵

فصل پنجم

منابع ۹۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پیش گفتار

کربونیک انیدرازها (کربنات هیدرولیازها) (CAs, EC ۴. ۲. ۱. ۱) متالو آنزیم‌های حاوی یون روی هستند که در تمامی پستانداران، گیاهان، جلبک‌ها و در گونه‌های وسیعی از پروکاریوت‌ها (یوباکترها و آرکئوباکترها) وجود دارند (Lindskog, 1997 & Smith *et al*., 2000; Supuran *et al*., 2004)، اما تاکنون کربونیک انیدراز در قارچ‌ها کشف نشده است (Smith *et al*., 2000 & Lindskog 1997) . این آنزیم یکی از ساده‌ترین و در عین حال مهمترین واکنش‌های سیستم فیزیولوژیک را که هیدراته شدن برگشت پذیر دی اکسید کربن به بی‌کربنات و پروتون است، کاتالیز می‌کند (Lindskog, 1997):

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

حتی در غیاب کاتالیست، این واکنش با سرعت متوسط (ثابت سرعت درجه دوم =$M^{-1}\ s^{-1}$ ۰/۰۰۲۷) انجام می‌پذیرد. اما با توجه به این حقیقت، تقریباً همه موجودات از کربونیک انیدراز به عنوان کاتالیست جهت تسریع این واکنش دو طرفه استفاده می‌نمایند. چنین فعالیت آنزیمی ضروری و مهم است چون، هیدراته‌شدن دی‌اکسیدکربن و دهیدراته شدن بی‌کربنات اغلب با واکنش‌های بسیار سریع همچون فرآیندهای انتقالی[۱] (به عنوان مثال، بی‌کربنات در خون باید خیلی سریع به شکل دی‌اکسیدکربن دهیدراته شود و این دی‌اکسیدکربن سریع به ریه‌ها جهت بازدم منتقل شود) همراه هستند (Banerjee, 2006). این آنزیم نقش اساسی را در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک، از جمله تنفس، فتوسنتز، تنظیم pH، جابجایی و انتقال دی‌اکسیدکربن و بی‌کربنات، انتقال یون، تعادل آب و الکترولیت، کلسی فیکاسیون، تعادل اسید و باز، تولید مایع زلالیه، تولید مایع مغزی-نخاعی، ایجاد تومور و انجام برخی از واکنش‌های بیوسنتزی (شامل مراحل مهمی از تولید ادرار، گلوکونئوژنز و لیپوژنز) و ... ایفا می‌کند (Supuran *et al*., 2003; Hewett-Emmett, 2000; Supuran *et al*., 2000 & Supuran *et al*., 2002)

[۱] Transpot processes

علاوه بر واکنش فیزیولوژیک مهم این آنزیم، هیدراته‌شدن برگشت پذیر دی اکسید کربن به بی‌کربنات (واکنش۱، شکل۱-۱)، کربونیک انیدرازها واکنش‌های متعدد دیگری را نیز کاتالیز می‌کنند که از جمله این واکنش‌ها می‌توان به هیدراته‌شدن سیانات به کربامیک اسید (واکنش ۲)، هیدراته‌شدن سیانامید به اوره (واکنش ۳)، هیدراته‌شدن آلدهیدها به جم‌دیول‌ها[1] (واکنش ۴)، هیدرولیز کربوکسیلیک یا سولفونیک (واکنش ۵ و ۶) و همچنین فرآیندهای هیدرولیتیکی که در مورد آن‌ها مطالعات کمتری صورت گرفته است (واکنش‌های ۷ تا ۹)، اشاره کرد. البته هنوز مشخص نیست که علاوه بر هیدراته‌شدن دی‌اکسیدکربن توسط کربونیک انیدراز، واکنش‌های دیگری که این آنزیم کاتالیز می‌کند نیز نقش فیزیولوژیک قابل توجهی دارند یا خیر(Supuran *et al*., 2003; Supuran *et al*., 2000 & Briganti *et al*., 1999).

$O{=}C{=}O + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$	(۱)
$O{=}C{=}NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCOOH$	(۲)
$HN{=}C{=}NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCONH_2$	(۳)
$RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2$	(۴)
$RCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH$	(۵)
$RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH$	(۶)
$ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar = 2,4-dinitrophenyl)	(۷)
$PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	(۸)
$RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (R = Me; Ph)	(۹)

شکل ۱-۱- واکنش‌های کاتالیزشده توسط آنزیم کربونیک انیدراز.

[1] *Gem*-diols

۱-۲- تاریخچه

کربونیک انیدراز به‌صورت همزمان اما مستقل توسط ملدروم[۱] و روتون[۲] و همچنین توسط استادی[۳] و اوبرین[۴] در سال ۱۹۳۳ کشف شد (Meldrum *et al*., 1933 & Stadie *et al*., 1933). در ابتدا این آنزیم، در نتیجه تحقیق برای یافتن یک عامل کاتالیتیک که از نظر تئوری وجود آن جهت انتقال سریع بی‌کربنات از اریتروسیت به مویرگ‌های ششی الزامی به نظر می‌رسید، کشف وتعیین ویژگی شد. ملدروم و روتون کربونیک انیدراز اریتروسیت را تقریباً با درجه بالایی تخلیص کردند و تخلیص کامل آنزیم از اریتروسیت‌های گاوی در اواخر دهه ۱۹۳۰ انجام شد (Meldrum *et al*., 1933; Keilin *et al*., 1939 & Keilin *et al*., 1940). در سال ۱۹۳۹ وجود کربونیک انیدراز در گونه‌های گیاهی مخصوصاً در گیاهان سبز توسط نیش[۵] مشخص گردید (Neich, 1939). در سال ۱۹۶۳، ویچ[۶] و بلانکنشیپ[۷] وجود اولین کربونیک انیدراز را در یک پروکاریوت گزارش کردند (Vitch *et al*., 1963). وجود این آنزیم در گونه‌های *نایسریا*[۸] و گونه‌ای از *استرپتوکوکوس سالیواروس*[۹] در این زمان به اثبات رسید. فعالیت کربونیک انیدرازی در قلمرو آرکئوباکترها اولین بار در متانوآرکئونی به نام *متانوسارکینا بیکری*[۱۰] دیده شد و این آنزیم برای اولین بار از متانوسارکینا ترموفیلا که بسیار به بیکری وابسته و نزدیک است، تخلیص و تعیین ویژگی شد (Karrasch *et al*., 1989 & Alber *et al*., 1994). مان و کیلین با یافتن اینکه فعالیت آنزیم به طور مستقیم در تناسب با محتویات یون روی است، نقش ویژه‌ای را برای این فلز در نظر گرفتند (Keilin *et al*, 1994).

---

[۱] Meldrum

[۲] Roughton

[۳] Stadie

[۴] O'Brein

[۵] Neish

[۶] Veitch

[۷] Blankenship

[۸] *Neisseria*

[۹] *Streptococcus salivarius*

[۱۰] *Methanosarcina bakeri*

۱-۳- خانواده کربونیک انیدراز

آنزیم کربونیک انیدراز انسانی[۱] اولین بار در سال ۱۹۶۱ از اریتروسیت تخلیص شد (Nyman, 1961 & Handerson *et al*., 1973). کربونیک انیدراز از لحاظ تکاملی توسط سه دسته ژنی غیر وابسته از لحاظ تکاملی به نام‌های α-CA، β-CA و γ-CA به رمز در می‌آید (Hewett-Emmett *et al*., 1996; Tashian *et al*., 1976 & Tashian, 1992). در مهره‌داران عالی، تاکنون ۱۵ ایزوزیم مختلف از این آنزیم شناسایی شده است که از لحاظ جایگاه درون سلولی، توزیع بافتی، فعالیت آنزیمی و همچنین حساسیت به مهارکننده‌های سولفونامیدی با یکدیگر بسیار تفاوت دارند (جدول۱-۱). ۵ تا از این ایزوزیم‌ها (CA I-III، CA VII و CA XIII) سیتوزولی هستند، ۲ تا (CA VA و CA VB) میتوکندریایی هستند، یکی از آن‌ها (CA VI) به فرم ترشحی است، ۴ تا (CA IV، CA IX، CA XII و CA XIV) به صورت متصل به غشا هستند، و ۳ ایزوزیم باقیمانده، (CAVIII، CAX و CAXI) نیز سیتوزولی ولی فاقد فعالیت کاتالیتیکی هستند (CA-like proteins). (Supuran *et al*., 2004; Banerjee, 2006; Supuran *et al*., 2003 & Supuran *et al*., 2002)

[۱] Human carbonic anhydrase (hCA)

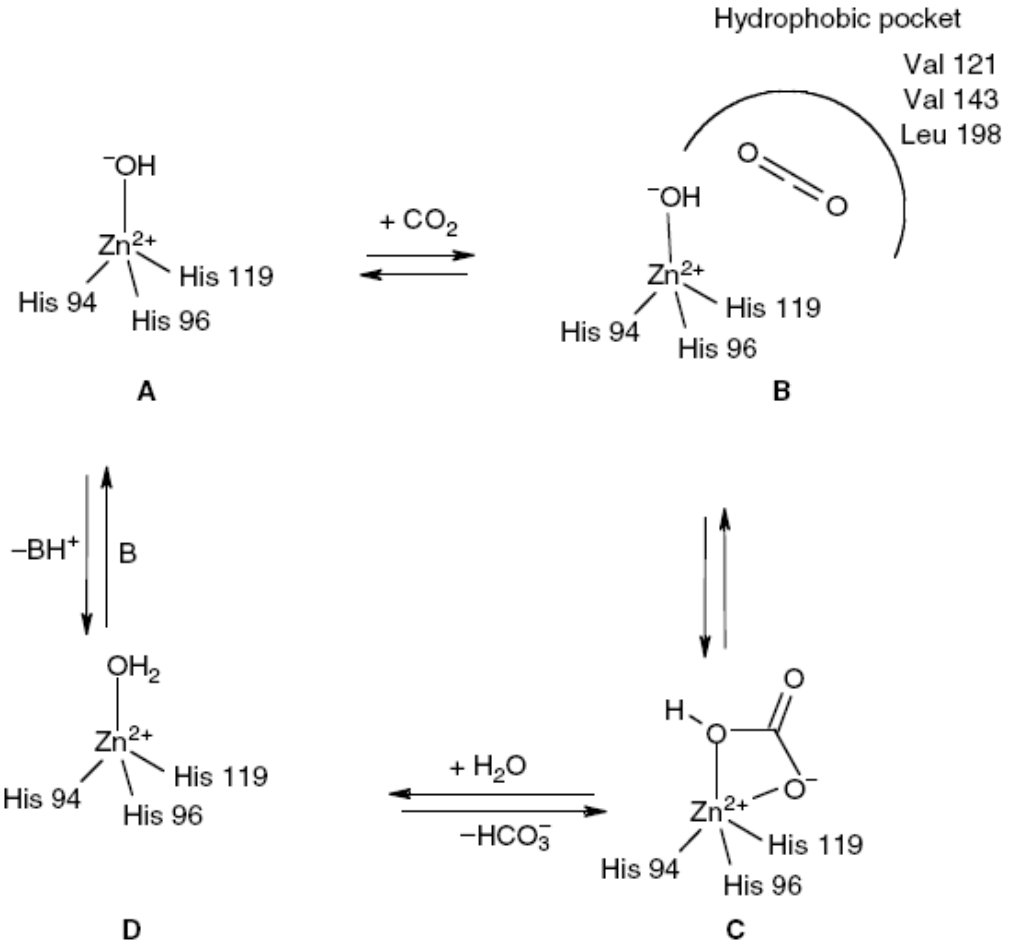
جدول۱-۱- ایزوزیم‌های α-کربونیک انیدراز مهره‌داران عالی: فعالیت هیدرازی CO_2، تمایل به مهارکننده‌های سولفونامیدی و موقعیت درون سلولی.

ایزوزیم	موقعیت درون سلولی	تمایل به سولفونامیدها	فعالیت کاتالیتیک (هیدراته کردن CO_2)
CA I	سیتوزول	متوسط	کم (۱۰٪ CA II)
CA II	سیتوزول	بسیار زیاد	زیاد
CA III	سیتوزول	بسیار کم	بسیار کم (۰/۳ ٪ CA II)
CA IV	غشایی	زیاد	زیاد
CA V	میتوکندری	زیاد	متوسط-زیاد
CA VI	ترشحی به درون بزاق	متوسط-کم	متوسط
CA VII	سیتوزول	بسیار زیاد	زیاد
CARP VIII	احتمالاً سیتوزول	----	بدون فعالیت
CA IX	غشایی	زیاد	زیاد
CARP X	سیتوزول	----	بدون فعالیت
CARP XI	سیتوزول	----	بدون فعالیت
CA XII	غشایی	نامعلوم	فعال (بدون داده‌های کمی)
CA XIII	سیتوزول	نامعلوم	احتمالاً زیاد
CA XIV	غشایی	نامعلوم	کم

۱-۳-۱-α-کربونیک انیدراز

α-کربونیک انیدرازها در مهره‌داران، باکتری‌ها، جلبک‌ها و سیتوپلاسم گیاهان سبز وجود دارند. همان‌طور که گفته شد یون روی (Zn^{2+}) برای عمل کاتالیتیکی کربونیک انیدراز ضروری است (Christianson *et al*., 1996 & Stams *et al*., 2000). کریستالوگرافی اشعه X نشان می‌دهد که این یون فلزی در عمق ۱۵ آنگسترومی شکاف جایگاه فعال قرار دارد. در این آنزیم سه جایگاه کئوردیناسیون توسط حلقه‌های ایمیدازول سه باقیمانده هیستیدین (His ۹۴، His ۹۶ و His ۱۱۹) و جایگاه چهارم توسط یک مولکول آب (یا یون هیدروکسید، وابسته به pH) اشغال شده است (Christianson *et al*., 1996 & Stams *et al*., 2000). به علت آن‌که همه گروه‌های اشغال‌کننده جایگاه‌های کئوردیناسیون خنثی هستند، بار کلی $Zn(His)_3$ ، ۲+ باقی می‌ماند (شکل ۱-۲). آب متصل شده به روی با گروه هیدروکسیل باقیمانده Thr ۱۹۹، که خود با گروه کربوکسیلات Glu ۱۰۶ یک پیوند هیدروژنی دیگر را تشکیل می‌دهد، پیوند هیدروژنی برقرار کرده است. این میان‌کنش‌ها سبب افزایش خاصیت هسته‌دوستی[۱] مولکول آب متصل به روی شده و سوبسترا (CO_2) را در موقعیتی مناسب جهت حمله هسته‌دوستی قرار می‌دهد (Lindskog *et al*., 2000; Stams *et al*., 2000 & Supuran *et al*., 2003). شکل فعال آنزیم شکل اصلی آن است که در آن گروه هیدروکسید به Zn (II) متصل شده است (Lindskog *et al*., 2000). این هسته‌دوست قوی به مولکول CO_2 در پاکت آب‌گریز حمله می‌کند (در مورد ایزوزیم CA II انسانی، پاکت آب‌گریز یا جایگاه اتصال سوبسترا از باقیمانده‌های Val ۱۲۱، ۱۴۳ Val و Leu ۱۹۸ تشکیل شده‌است) و منجر به تشکیل بی‌کربنات کوئوردینه‌شده با Zn (II) می‌شود (شکل ۱-۲) (Christianson *et al*., 1996).

[۱] Nucleophilicity

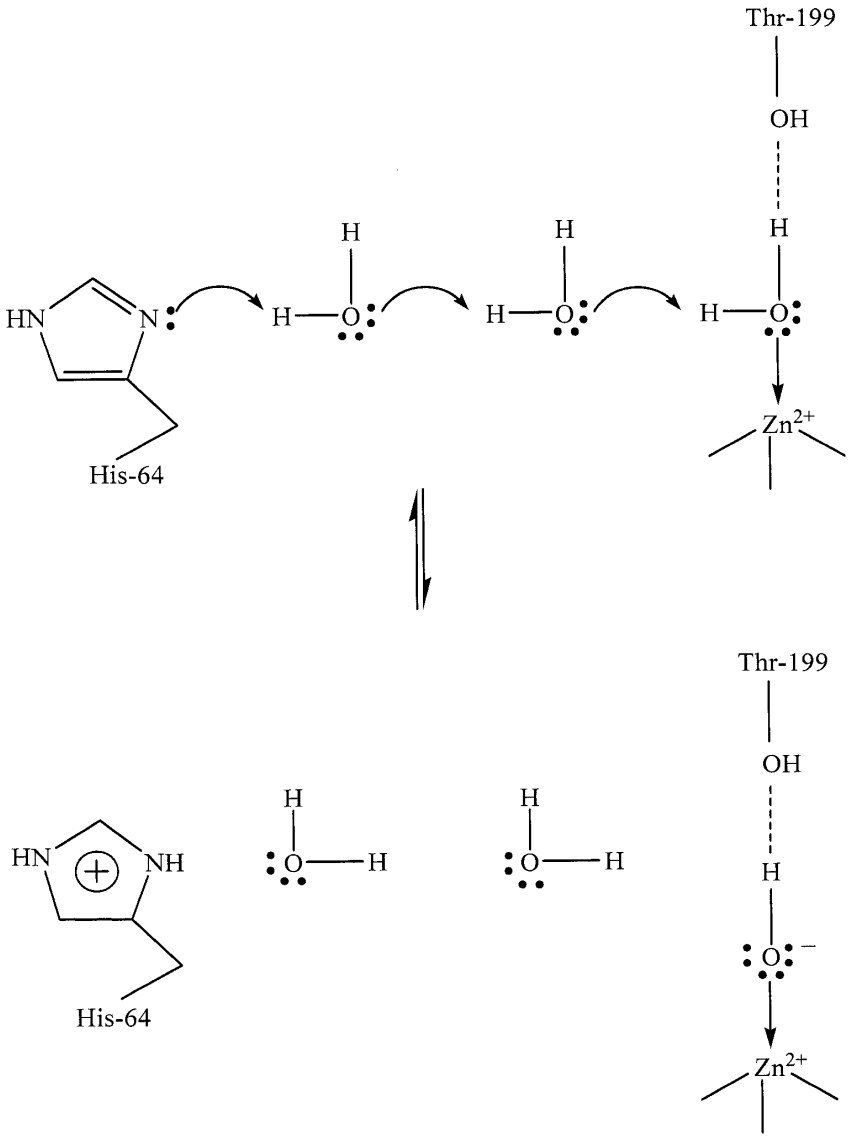


شکل۱-۲- نمایش شماتیک کاتالیز هیدراته‌شدن دی‌اکسیدکربن توسط کربونیک انیدراز. پاکت آب‌گریز برای اتصال سوبسترا به صورت شماتیک در مرحله B نشان داده شده است.

پس از تشکیل بی‌کربنات کوئوردینه‌شده با Zn (II) ، یون بی‌کربنات با یک مولکول آب تعویض می‌شود و وارد محلول می‌شود و این امر منجر به تشکیل فرم اسیدی آنزیم (شکلی از آنزیم که در آن آب با یون روی کوئوردینه شده‌است)، که از لحاظ کاتالیتیکی فرم غیر فعال آنزیم محسوب می‌شود، می‌گردد (شکل ۱-۲ مرحله D) (Bertini *et al*., 1982 & Supuran *et al*., 2003). آنزیم برای برگشت به شکل بازی و فعال خود (شکل ۱-۲ مرحله A) نیاز به یک واکنش انتقال پروتون از جایگاه فعال به محیط دارد که این امر ممکن است توسط باقیمانده‌های جایگاه فعال مثل ۶۴ His که شاتل پروتونی در ایزوزیم‌های I، II، IV، VII و IX می‌باشد (شکل۱-۳) و یا بافر موجود در محیط واکنش (BH^{+}) صورت بگیرد. مراحل این فرآیند به‌صورت شماتیک در معادله‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

$$EZn^{2+} - OH^- + CO_2 \Leftrightarrow EZn^{2+} - HCO_3^- \overset{H_2O}{\Leftrightarrow} EZn^{2+} - OH_2 + HCO_3^- \quad (1)$$

$$EZn^{2+} - OH_2 \Leftrightarrow EZn^{2+} - HO^- + H^+ \quad (2)$$



شکل۱-۳- مکانیسم جابجایی پروتون بین آب متصل به روی و His ۶۴ کربونیک انیدراز II. هنگامی‌که یون هیدروکسید به روی در آنزیم متصل است، آنزیم از لحاظ کاتالیتیک فعال است و برای انجام واکنش هیدراته شدن آماده می‌باشد.

مرحله محدودکننده سرعت در واکنش کاتالیزی کربونیک انیدراز، واکنش دوم یعنی معادله ۱ است (انتقال پروتون منجر به ایجاد شکل فعال آنزیم می‌شود). در ایزوزیم‌های بسیار فعال کاتالیتیک، مثل CAII، CA V، CA VII و CA IX، این فرآیند با همکاری His شماره ۶۴ در ورودی جایگاه فعال و همچنین خوشه‌ای از هیستیدین‌ها که در لبه جایگاه فعال به‌صورت برآمده قرار دارند، صورت می‌گیرد. در کربونیک انیدراز II که یکی از فعال‌ترین ایزوزیم‌های کربونیک انیدراز است، این انتقال پروتون بسیار کارآمد صورت می‌پذیرد (شکل ۱-۳) (Supuran *et al*., 2004 & Briganti *et al*., 1997).

۱-۳-۱-۱- کربونیک انیدراز II (CA II)

در بین ایزوزیم‌های مختلف α-کربونیک انیدراز، کربونیک انیدراز II (که قبلاً به نام CA C خوانده می‌شد) (Lindskog, 1997) به طور وسیعی از لحاظ ساختاری، عملکردی و مکانیسم مورد مطالعه قرار گرفته است. کربونیک انیدراز II، ایزوزیمی با فعالیت بالا و سرعت تبدیل[۱] $۱\times ۱۰^{۶} s^{-۱}$ در pH ۹ و دمای ۲۵ ^{o}C در جهت هیدراته‌کردن دی‌اکسیدکربن می‌باشد (Khalifah, 1971 & Steiner *et al*., 1975). CA II، همچنین هیدرولیز استرهای آروماتیک و آلیفاتیک را کاتالیز می‌کند و نسبت به ایزوزیم I به مهارکننده‌های سولفونامیدی بسیار حساس‌تر است (Sly *et al*., 1995 & Supuran *et al*., 2003).

این ایزوزیم تقریباً در سیتوزول سلول‌های تمام بافت‌ها واندام‌ها یافت می‌شود (Tashian, 1992 & Khalifah, 1971). انواعی از سلول‌ها که CA II را بیان می‌کنند شامل استئوکلاست‌ها در استخوان[۲]، الیگودندروسیت‌ها[۳] و اپیتلیوم شبکه کوروئیدی[۴] در مغز، اجسام مژگانی و عدسی در چشم، سلول‌های مولر در شبکیه چشم[۵]، کبد (عمدتاً در هپاتوسیت‌هایی که در اطراف ورید باب هستند)، کلیه (لوله‌های دیستال، لوله های پروکسیمال و سلول‌های مجاری جمع‌کننده در بخش کورتکس کلیه)، سلول‌های مجرای پانکراس، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های اپیتلیال غدد بزاقی، سلول‌های اپیتلیال سمینال وزیکول و مجاری دفران، اریتروسیت‌ها و اسپرماتوزوآ می‌باشند (Kaunisto *et al*., 1990 & Parkkila *et al*., 1991).

---

[۱] Turn over rate

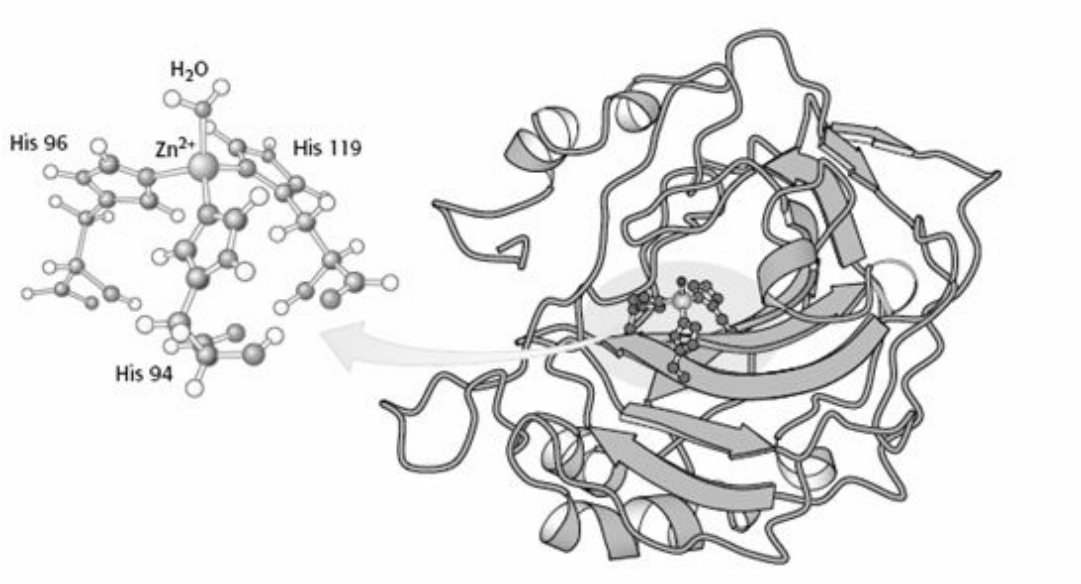
[۲] Osteoclasts

[۳] Oligodendrocytes

[۴] Epithelium of the choroids plexus

[۵] Retinal Muller cells

وظایف فیزیولوژیک کربونیک انیدراز II در سلول‌هایی که دارای این ایزوزیم هستند، بسیار متنوع است. در برخی از سلول‌ها (برای مثال در سلول‌های اپیتلیال غدد بزاقی، معده، هپاتوسیت‌ها و غیره) نقش عمده‌ای را در تعادل اسید و باز ایفا می‌کند. در روده بزرگ وکیسه صفرا، کربونیک انیدراز II در عمل جذب آب و نمک دخالت دارد (Sly *et al*., 1995 & Schwartz *et al*., 1993). این ایزوزیم در تبادل دی‌اکسید کربن در اریتروسیت‌ها، ریه و کلیه‌ها نقش دارد (Lonnerholm *et al*., 1985). مطالعات نشان می‌دهد که بیان ویژه بافتی[1] کربونیک انیدراز II، مربوط به تنظیم در سطح رونویسی آنزیم است (Schwartz *et al*., 1993). همچنین این ایزوزیم در تنظیم هورمونی رحم، استخوان و کلیه‌ها نقش مهمی را دارا می‌باشد. مشاهدات اخیر پیشنهاد می‌کند که به هنگام اسیدوز متابولیک، این ایزوزیم بیان بالایی در سلول‌های کلیه دارد (Tashian, 1992). ساختار کربونیک انیدراز II انسانی در شکل (۱-۴) نشان داده شده است.



شکل۱-۴- ساختار کربونیک انیدراز II انسانی و جایگاه روی در آن. (سمت چپ) روی به حلقه‌های ایمیدازول سه اسید آمینه هیستیدین و همچنین به آب متصل شده است. (سمت راست) موقعیت جایگاه روی در آنزیم (Berg *et al*., 2002).

[1] Tissue-specific expression

۱-۳-۲- β-کربونیک انیدراز

بسیاری از باکتری‌ها، تعدادی از آرکئوباکترها (مثل *متانوباکتریوم ترمواتوتروفیکوم*[۱])، جلبک‌ها و کلروپلاست‌های گیاهان عالی، حاوی کربونیک انیدرازهایی متعلق به خانواده β-کربونیک انیدراز هستند (Smith *et al*., 1999; Kimber *et al*., 2000; Mistsuhashi *et al*., 2000 & Cronk *et al*., 2001) تفاوت اساسی بین این آنزیم‌ها و α-کربونیک انیدرازها در این است که β-کربونیک انیدرازها معمولاً به صورت الیگومرهایی هستند که این الیگومرها عموماً از دو یا شش منومر که هر منومر دارای وزن مولکولی ۲۵ تا ۳۰ کیلودالتون است، تشکیل شده‌اند. ساختارهای به دست آمده از کریستالوگرافی اشعه X از چهار نوع از β-کربونیک انیدرازها هم اکنون در دسترس است:

۱) آنزیم تخلیص‌شده از جلبک قرمز *پورفیریدیوم پرپریوم*[۲] (Mistsuhashi *et al*., 2000)

۲) آنزیم به دست آمده از کلروپلاست *پیزوم ساتیووم*[۳](Kimber *et al*., 2000)

۳) آنزیم پروکاریوتی جداشده از *اشرشیا کولی*[۴] (Cronk *et al*., 2001)

۴) Cab، که یک آنزیم جداشده از آرکئون *متانوباکتریوم ترمواتوتروفیکوم* است (Strop *et al*., 2001).

۱-۳-۳- γ-کربونیک انیدراز

گیاهان خانواده Cam[۵] اولین کربونیک انیدرازهای شناخته شده از کلاس γ-کربونیک انیدراز می‌باشند که از آرکئون متانوژنیک *متانوسارکینا ترموفیلا* اجدادی جدا شده‌اند (Iverson *et al*., 2000). چندین ویژگی، Cam را از α- و β-کربونیک انیدرازها متمایز می‌سازد. منومرهای Cam به‌طور خود به خود به‌صورت هترودایمرهایی با وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلودالتون در می‌آیند (Iverson *et al*., 2000 & Kisher 1996). ساختار کریستالی این آنزیم سه جایگاه اتصال روی که بسیار شبیه به این جایگاه‌ها در

---

[۱] *Methanobacterium thermoautotrophicum*

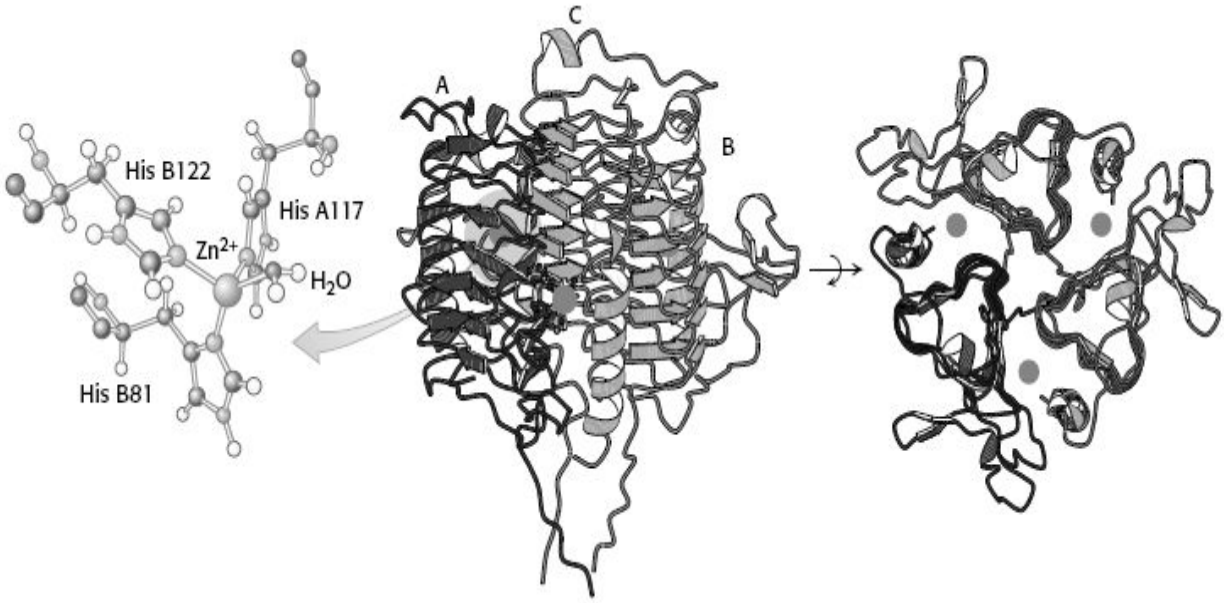
[۲] *Porphyridium purpureum*

[۳] *Pisum sativum*

[۴] *E. coli*

[۵] Crassulacean acid metabolism

α-کربونیک انیدرازهاست را مشخص کرده است. در این حالت، سه جایگاه اتصال روی، در حد فاصل[1] سه زیرواحد آنزیم تریمر قرار گرفته است (شکل۱-۵). ساختار مارپیچ β چپ گرد و بسیار فشرده (یک رشته β به‌داخل یک مارپیچ چپ گرد پیچیده شده) موجود در این آنزیم نیز در آنزیم‌هایی که واکنش‌های غیر مرتبط با واکنش‌های کربونیک انیدراز را کاتالیز می‌کنند، یافت شده است. بنابراین، تکامل همگرا حداقل در سه زمان کربونیک انیدرازهایی را به وجود آورده که به یون‌های روی متکی می‌باشند و در هر سه دسته آنزیم، فعالیت کاتالیزی به مولکول‌های آب متصل به روی وابسته است (Berg *et al*., 2002).



شکل۱-۵- γ-کربونیک انیدراز. (چپ) جایگاه اتم روی در γ-کربونیک انیدراز. (وسط) ساختار تریمری پروتئین (زنجیرها با A، B و C مشخص شده‌اند). (راست) برای نشان دادن تقارن سه وجهی و موقعیت جایگاه فلز روی موجود در حدفاصل زیر واحدها، پروتئین چرخانده شده است (Berg *et al*., 2002).

۱-۴- ارتباط کربونیک انیدراز با برخی از بیماری‌ها

بسیاری از بیماری‌ها در ارتباط با ایزوزیم‌های کربونیک انیدراز هستند (جدول ۱-۲). تعدادی از این بیماری‌ها به علت نقص و تعدادی دیگر به علت بیان بالای بعضی از ایزوزیم‌های کربونیک انیدراز در بافت‌های مختلف می‌باشند، که منجر به ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی می‌شوند. با این حال تا کنون، فقط

[1] Interface